

اثر روغن زیتون بکر بر حجم سکنه مغزی، سطح سر آمید، سربروزید و فسفاتیدیل کولین مغز در مدل سکنه ی مغزی موش صحرایی

زهرا ربیعی^۱، دکتر محمدرضا بیگدلی^{۲*}، فاطمه محقق^۲

^۱مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه فیزیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۸ اصلاح نهایی: ۹۱/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱

چکیده:

زمینه و هدف: سکنه مغزی سومین عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی بعد از بیماری های قلبی - عروقی و سرطان است. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین اثر روغن زیتون بکر بر سطح لیپیدهای مغزی و کاهش حجم سکنه مغزی در مدل سکنه مغزی موش صحرایی انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۵ گروه ۱۲ تایی موش صحرایی نر استفاده شد. این گروه ها شامل کنترل، شم و سه گروه آزمایشی بودند که دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن روغن زیتون بکر را به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند. دو گروه کنترل و شم آب مقطر دریافت کردند. دو ساعت بعد از آخرین دوز گاواژ شده هر گروه ۱۲ تایی به دو زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه MCAO (middle cerebral artery occlusion)، به منظور اندازه گیری حجم سکنه مغزی و زیر گروه دیگر برای آنالیز لیپیدهای مغزی استفاده شد. داده ها با استفاده از آزمون های ANOVA و تست تعقیبی LSD و آزمون ضریب همبستگی پیرسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: پیش تیمار با روغن زیتون بکر خوراکی با دوز ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم در روز باعث افزایش سطح فسفاتیدیل کولین بافت مغز گردید ($P<0/05$). همچنین روغن زیتون بکر در دوز ۰/۷۵ میلی لیتر باعث افزایش سطح سربروزید مغزی شد ($P<0/05$). روغن زیتون بکر در دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر سرآمید مغزی را کاهش داد ($P<0/05$). تغذیه با روغن زیتون بکر سبب کاهش حجم سکنه مغزی گردید. بین افزایش سطح فسفاتیدیل کولین مغزی ($P=0/001$ و $r^2=0/45$)، افزایش سربروزید مغزی ($P=0/018$ و $r^2=0/28$) و همچنین کاهش سرآمید مغزی ($P=0/001$ و $r^2=0/62$)، با کاهش حجم سکنه مغزی در گروه های آزمایشی ارتباط معنی داری وجود داشت.

نتیجه گیری: روغن زیتون بکر ممکن است با اثر بر سطح لیپیدهای مغزی سبب کاهش حجم سکنه مغزی و محافظت عصبی شود.

واژه های کلیدی: ایسکمی مغزی، روغن زیتون بکر، سرآمید، سربروزید، فسفاتیدیل کولین، موش صحرایی.

مقدمه:

غلظت کلسیم درون سلولی و کاهش ATP در ایسکمی، اسیدهای چرب آزاد رها شده و غشا آسیب می بیند (۱). در طول ایسکمی افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی موجب فعال شدن نیتریک اکسید سنتازهای وابسته به کالمدولین می شود و غلظت های غیر فیزیولوژیکی NO (nitric oxide) آسیب های نیتروساتیو در پی دارد (۲). همچنین از ترکیب NO و سوپراکسید ترکیبی به نام

در طول ایسکمی غلظت اسیدهای چرب آزاد به خصوص آراشیدونیک اسید به میزان زیادی افزایش می یابد. در واقع افزایش کلسیم درون سلولی در ایسکمی باعث فعال شدن فسفولیپاز A و C شده که این آنزیم ها سبب هیدرولیز فسفولیپیدها می شوند و این در حالی است که سنتز مجدد فسفولیپیدها نیازمند حضور ATP است. در نتیجه به دنبال افزایش

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، تلفن: ۰۹۸۲۱۲۹۹۰۲۷۳۱،

E-mai:bigdelimohammadreza@yahoo.com

چشمگیری با افزایش طول ایسکمی بعد از ۳۰ دقیقه وقتی با گروه کنترل مقایسه شود کاهش می یابد. آنالیزهای بافت شناسی از مغز بعد از ایسکمی نشان می دهد که میلین به آسیب ایسکمی مقاوم است و تخریب ساختار میلین در طی دوره ی پایانی آسیب ایسکمی اتفاق می افتد (۷).

متابولیسم لیپیدی ممکن است اهمیت ویژه ای برای سیستم عصبی داشته باشد و مغز بعد از بافت چربی دومین بخش در بدن است که غلظت بالای لیپیدها را دارد. تغییر در متابولیسم لیپیدهای مغزی باعث ایجاد بسیاری از اختلالات عصبی، شامل اختلالات دو قطبی (bipolar)، شیذوفرنی و بیماری های تحلیل عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون و بیماری نیمن پیک می شود (۵). آسیب ایسکمی با دو واقعه جداگانه شناخته می شود: مرگی غیر قابل اجتناب در طی چند دقیقه اول سکنه و در ناحیه ای که هیچ گونه جریان خون و در نتیجه هیچ ATP ای وجود ندارد، این ناحیه به نام کانون ایسکمی شناخته می شود. اما در اطراف این ناحیه ی دچار نکروز شده، منطقه ای وجود دارد که در آنجا جریان خون هنوز به مقدار کمی وجود دارد، بافتی که از لحاظ الکتریکی خاموش است و به سختی به میزان کافی جریان خون به منظور زنده ماندن می گیرد، ناحیه ای که به آن پنومبرای ایسکمی می گویند. در مدل ایسکمی MCAO (middle cerebral artery occlusion) کانون معادل ناحیه زیر قشری و پنومبرا، معادل ناحیه قشری مغز می باشد (۸). میوه زیتون (*Olea europaea*) و برگ های درخت آن به دلیل اینکه ترکیبات فنولی بسیاری دارند نقش مهمی در پزشکی و درمان بیماری ها ایفا می نمایند. اولئوروپین یک ترکیب بیواکتیو اصلی از میوه زیتون است که به طور گسترده ایی در میوه های نرسیده و برگ های آن وجود دارد. تیروزول و هیدروکسی تیروزول دو شاخص مهم از ترکیبات فنولی روغن زیتون هستند که به اشکال آزاد یا مرکب وجود دارند. هر چند محتوی فنول ها در میان ارقام مختلف زیتون بسته به محل کشت آنها متفاوت است، فرم آزاد

پراکسی نتریت به وجود می آید که در نهایت تمام این اکسیدان ها سبب آسیب به لیپیدها، پروتئین ها و DNA می شوند (۳). آسیب رادیکال های آزاد مکانیسمی است که در فازهای اولیه ایسکمی شروع می شود و یکی از وقایع اصلی در این زمان وقوع پراکسیداسیون لیپیدی است. متابولیسم اسیدهای چرب آزاد آثار مخربی چون مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو و تبدیل اسید آراشیدونیک به ایکوزانوئیدهایی مثل ترومبوکسان و پروستاگلاندین ها توسط سیکلواکسیژناز را باعث می گردد. از دیگر آثار مخرب متابولیسم اسیدهای چرب آزاد تولید رادیکال های آزاد و واکنش های زنجیره ای واسطه شده با پراکسید لیپیدها است. هیدروکسی نائال (hydroxynoneal) محصول ناشی از پراکسید لیپیدهاست که ممکن است القا کننده ی آپوپتوز باشد. همچنین پراکسی نتریت می تواند از طریق واکنش با لیپیدها تجزیه شده و محصولات حاصل از تجزیه اش مثل رادیکال های هیدروکسیل و نیتروژن دی اکسید، پراکسیداسیون لیپیدها را به راه بیدازد (۱). در فاز تاخیری ایسکمی، مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می باشد که با علائمی چون انقباض کروماتین هسته ای، تکه تکه شدن DNA، چروک شدن سیتوپلاسم و حبابی شکل شدن غشا اتفاق می افتد (۴). آپوپتوز توسط فاکتورهای متعددی و از طریق مسیر داخلی با واسطه میتوکندری و یا مسیر خارجی با واسطه گیرنده هایی که منشا آن ها میتوکندری نیست فعال می شود (۵).

فسفاتیدیل کولین توسط فسفولیپاز A2, C, D (PLA2, PLC, PLD) هیدرولیز می شود. فسفاتیدیل کولین توسط CTP فسفوکولین سیتیدیل ترانسفراز (CCT) که سیتیدین - ۵ - دی فسفاتیدیل کولین را می سازد سنتز می شود و مرحله آخر سنتز فسفاتیدیل کولین توسط CDP کولین ۲ و ۱ دی آسیل گلیسرول کولین فسفو ترانسفراز کاتالیز می شود. در مغز سنتز فسفاتیدیل کولین غالباً از طریق مسیر CDP کولین (cytidine-5'-diphosphocholine) انجام می شود (۶). محتوی سربروزید کورتکس فرونتال به طور

تیروزول و هیدروکسی تیروزول و مشتقات secoroid آنها حدود ۳۰ درصد و سایر اشکال ترکیبی آنها مثل اولئوروپین و ligstrosideaglycone تقریباً نصف ترکیبات فنولی را تشکیل می دهند (۸). این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پیش درمان با روغن زیتون بکر با سطح فسفاتیدیل کولین، سربروزید و سرآمید مغزی و حجم سکنه مغزی که ناشی از مرگ سلولی است انجام گرفت.

روش بررسی:

زیتون زرد با نام علمی *Olea europaea* که قسمت عمده زیتون ایران را تشکیل می دهد از مرکز تحقیقات زیتون رودبار دست چین و همراه با هسته آسیاب شد. سپس روغن آن به وسیله سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استخراج و در ظرفی تیره در دمای ۱۰-۱۵ درجه سلسیوس نگهداری شد.

در این مطالعه از موش های صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم که از پژوهشکده علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی خریداری شدند استفاده گردید. حیوانات حین و قبل از مطالعه در شرایط دوازده ساعته تاریکی-روشنایی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند و با غذای استاندارد موش های صحرایی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران تغذیه شدند.

حیوانات مورد مطالعه به صورت تصادفی در ۵ گروه به شرح ذیل تقسیم شدند و در هر گروه ۱۲ سر موش صحرایی قرار گرفت: گروه کنترل، گروه شم و سه گروه آزمایشی که روغن زیتون را با دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۳۰ روز از طریق گاواژ دریافت نمودند. گروه های کنترل و شم با آب مقطر گاواژ شدند. دوزهای انتخابی بر اساس مطالعات انجام شده ی قبلی بود (۹) و بر اساس میانگین مصرف روغن زیتون در مدیترانه که ۴۶ گرم در روز است انتخاب شد (۱۰). دو ساعت بعد از آخرین تیمار، هر گروه اصلی که شامل ۱۲ سر موش بود، به دو

زیر گروه شش تایی تقسیم شد. زیر گروه اول که شریان میانی مغز آنها مسدود شد برای اندازه گیری حجم سکنه مغزی مورد استفاده قرار گرفتند و زیر گروه دوم به صورت دست نخورده باقی مانده و لیپیدهای مغز آنها بررسی شد. گروه شم جراحی شدند ولی ایسکمی مغزی در آنها ایجاد نشد.

برای ایجاد مدل سکنه مغزی (انسداد شریان مغزی) موش ها بعد از توزین، با داروی کلرال هیدرات (شرکت مرک آلمان) به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. جراحی مدل سازی انسداد شریان میانی مغز یا همان MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام شد (۱۱). به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۳-۰ وارد ECA (external carotid artery) می شد و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی از طریق عبور از ICA (internal carotid artery) و در حالی که رگ پتریگوپالاتین بسته بود پیش می رفت. در اثر تماس نخ بخیه و (anterior cerebral artery) ACA جریان خون از هر طرف به سوی (middle cerebral artery) MCA بسته شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلیمتر طول نخ از تنه ECA مشخص شد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم با کمک دماسنج دیجیتالی (geratherm color, Germany) اندازه گیری و در حدود ۳۷ درجه سلسیوس حفظ شد. محقق و همکاران اندازه گیری میزان جریان خون مغزی در حین سکنه را به طور دقیق انجام داده اند و در این تحقیق به دلیل همپوشانی با کار محقق و همکاران این اندازه گیری را تکرار نکردیم (۱۵).

ارزیابی حجم آسیب بافتی به این صورت انجام شد که مغزها به سرعت خارج شدند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در سالین سرد قرار گرفتند. سپس، مغز موش های صحرایی در ماتریکس مغز قرار گرفتند و به طور کرونال به مقاطع ۲ میلی متر برش داده شدند. این مغزها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲ درصد

۲، ۳، ۵ - تری فیل تترازولین کلراید (TTC) (شرکت مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای رنگ آمیزی حیاتی انکوبه شدند. از برش‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال قابل اتصال به کامپیوتر عکس برداری شد. مساحت ناحیه آسیب بافتی (مناطق که رنگ نمی گرفت) هر برش با استفاده از نرم افزار UTHSCSA Image Tool اندازه گیری شد و با ضرب کردن مساحت های مذکور در ضخامت ۲ میلی متر و جمع اعداد حاصل از ۸ برش حجم ناحیه آسیب بافتی محاسبه شد (۱۲).

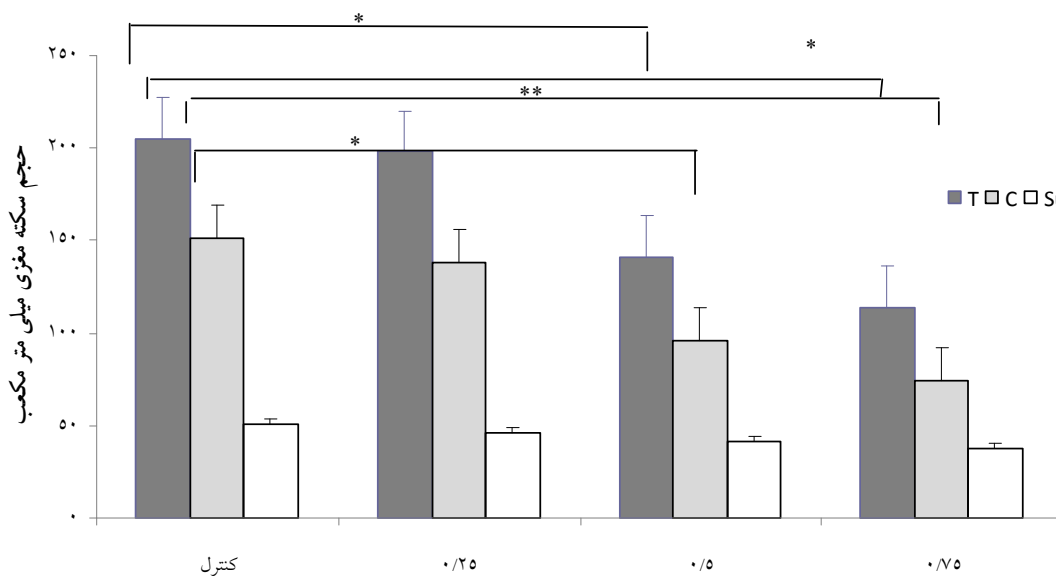
در پایان روز سی ام تمام موش های صحرایی از طریق تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کشته شدند و مغزشان بعد از جدا نمودن سرشان، به سرعت خارج شد و نیمکره ی راست مغز از سایر قسمت های مغز مثل نیمکره ی چپ و مخچه و پل مغزی جدا شده و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس برای آنالیزهای لیپیدی نگهداری شدند. نمونه ی مغزی با ۵ میلی لیتر کلروفرم و متانول با حجم ۱ به ۱ و ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر روی مگنتیک استیرر در دمای اتاق به مدت حداقل ۸ ساعت گذاشته شد و با این روش کل لیپیدها از بافت مغزی جداسازی شدند. بعد از ۸ ساعت نمونه از روی استیرر برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد سپس سوپ بافتی برداشته شد و رسوب باقیمانده و ظرفی که مغز در آن هموژن شده بود را با ۲ میلی لیتر کلروفرم و متانول با حجم ۱ به ۱ شسته و دوباره سانتریفیوژ شدند و مجدداً سوپ بافتی برداشته و با سوپ بافتی اولیه ترکیب شد و در دمای ۴ درجه برای جداسازی، خالص سازی و شناسایی لیپیدها نگهداری شدند. جداسازی لیپیدها با استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE – sephadex (di ethyl amino ethyl) دی اتیل آمینو اتیل انجام شد. ستون بعد از آماده سازی دو بار با حلال A که شامل کلروفرم: متانول: آب به صورت ۸:۶:۳۰ شستشو داده شد. لیپیدهای خنثی در حلال A جمع آوری شدند و شامل: فسفاتیدیل کولین، سرروزید و سرآمید بودند (۱۳). لیپیدها بر روی پلیت ۱۰×۲۰ سیلیکاژل HPTLC

۶۰ (شرکت مرک آلمان) با استفاده از دستگاه HPTLC مدل Camag – linomat auto TLC – spotter نقطه گذاری شدند. بعد از اتمام نقطه گذاری، پلیت ها در بافری که شامل کلروفرم، متانول، استیک اسید، فرمیک اسید (با حجم ۶۵:۳۵:۲:۱) بود غوطه ور شدند تا بافر تا ارتفاع ۴/۵ سانتی متری پلیت بالا رود سپس از بافر خارج شده خشک شدند و در بافر دوم که شامل هگزان، دی ایزوپروپیل اتر، استیک اسید با حجم (۶۵:۳۵:۲) غوطه ور شدند به نحوی که بافر تا ارتفاع ۱۰ سانتی متری پلیت حرکت کند و لیپیدها بر روی باند های جدا در پلیت قرار گیرند. لیپیدهای خنثی روی پلیت با استفاده از معرف کوپریک استات ۳ درصد در محلول ۸ درصد فسفریک اسید به دنبال حرارت دادن در آون با دمای ۱۷۰-۱۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه ظاهر شدند و سپس پلیت ها توسط دستگاه scanner مدل Camag در طول موج ۳۵۰ نانومتر اسکن شدند (۱۴).

تمام آنالیزها با کمک نرم افزار SPSS انجام شد. داده ها با استفاده از آزمون های ANOVA و تست تعقیبی LSD و آزمون ضریب همبستگی پیرسون تجزیه و تحلیل شدند. $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

پیش تیمار با روغن زیتون بکر با دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۰ روز قبل از ایجاد مدل MCAO باعث کاهش حجم سکنه مغزی در کل منطقه نیمکره راست مغزی شد که این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($P < 0/05$). پیش تیمار با روغن زیتون بکر با دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۳۰ روز در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش حجم سکنه مغزی در منطقه کورتکس مغزی می شود ($P < 0/05$)، در حالی که دوز ۰/۲۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز بدون اثر مشاهده شد ($P > 0/05$). نوروپروتکشن ایجاد شده توسط (virgin olive oil) VOO بیشتر در منطقه پنومبرای کورتکس و به مقدار



نمودار شماره ۱: حجم سگته مغزی در (T: کل)، (Su: ساب کورتکس)، (C: کورتکس) مناطق مغزی.

واحد دوز روغن زیتون میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز می باشد، مدت تیمار ۳۰ روز بوده است، $P < 0.05$ ، $n = 6$.

افزایش سطح سربروژید مغزی می شود که این افزایش ها در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). پیش تیمار با روغن زیتون بکر به مدت ۳۰ روز در دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش سطح سرآمید مغزی شد که این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($P < 0.05$).

اندکی در ناحیه کوکورتکس دیده شد (نمودار شماره ۱ و تصویر شماره ۱). کاهش حجم آسیب بافتی نشان دهنده پدیده ی تحمل به ایسکمی است که در اثر مصرف روغن زیتون بکر ایجاد شده است (تصویر شماره ۱). روغن زیتون بکر خوراکی باعث افزایش سطح فسفاتیدیل کولین مغزی در دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز شد. همچنین در دوز ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز باعث



تصویر شماره ۱: اثر دوزهای مختلف روغن زیتون بر حجم سگته مغزی.

کاهش حجم آسیب بافتی و نقص های نورولوژیک، اثر پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از مصرف روغن زیتون بکر را اثبات نمود، در واقع این تحمل در ناحیه پنومبرا و نه در کانون ایسکمی به وجود آمد، زیرا حجم سگته در نواحی کانونی ایسکمی در گروه های تیمار شده با گروه شاهد تفاوتی نداشت. واحد دوز عصاره میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز می باشد.

ارتباط معنی داری بین افزایش سطح فسفاتیدیل کولین مغزی با کاهش حجم سکنه مغزی وجود داشت ($r^2=0/45$ ، $P=0/001$). همچنین این ارتباط بین افزایش سربروزید مغزی با کاهش حجم سکنه مغزی در گروه های آزمایشی معنی دار بود ($r^2=0/28$ ، $P=0/018$) و بین کاهش سرآمد مغزی با کاهش حجم سکنه مغزی در گروه های آزمایشی ارتباط معنی داری وجود داشت ($r^2=0/65$ ، $P=0/001$).

بحث:

در این مطالعه دیده شد که پیش تیمار با روغن زیتون بکر باعث افزایش سطح فسفاتیدیل کولین و سربروزید مغزی و کاهش سرآمد مغزی در مقایسه با گروه کنترل می شود. همچنین تیمار با روغن زیتون بکر باعث کاهش حجم سکنه مغزی در گروه های آزمایشی می شود. محقق و همکاران نشان دادند که روغن زیتون خوراکی در مقایسه با گروه شاهد حجم آسیب بافتی را کاهش می دهد که این کاهش در دوزهای ۰/۵ و ۰/۷۵ از لحاظ آماری معنی دار بوده است و این تحمل به ایسکمی، در ناحیه پنومبرا و نه در کانون ایسکمی به وجود آمده است، زیرا حجم سکنه در نواحی کانونی ایسکمی در گروه های تیمار شده با گروه شاهد تفاوتی نداشته است، اما در مورد ناحیه پنومبرا، کاهش معنی داری نشان داده شده است (۱۵). همچنین روغن زیتون در دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز، سبب افزایش معنی دار سطح کلسترول و تری گلیسرید خون در مقایسه با گروه شاهد می شود (۱۵). در مطالعه ای دیگر تزریق داخل صفاقی تیروزول که یکی از پلی فنول های اصلی روغن زیتون است در ابتدای ایسکمی و خونرسانی مجدد با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب کاهش حجم سکنه و بهبودی عملکردهای نورولوژیکی پس از القای ایسکمی کانونی در رتهای نر شده است (۱۶). مطالعات نشان داده اند که هیدروکسی تیروزول خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد ترومبوتیک

دارد و می تواند کلسترول خون را کاهش دهد (۱۷) هیدروکسی تیروزول با خاصیت جمع کنندگی یون آهن و افزایش بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید می شود (۱۷).

در واقع افزایش کلسیم درون سلولی در ایسکمی باعث فعال شدن فسفولیپاز C و A می شود که این آنزیم ها سبب هیدرولیز فسفولیپیدها می شوند و این در حالی است که سنتز مجدد فسفولیپیدها نیازمند حضور ATP است. در نتیجه به دنبال افزایش غلظت کلسیم درون سلولی و کاهش ATP در ایسکمی، اسیدهای چرب آزاد رها شده و غشا آسیب می بیند. ایسکمی مغزی همچنین باعث فعال شدن فسفاتیدیل کولین فسفولیپاز C (ptdcho-PLC) و فسفاتیدیل کولین فسفولیپاز D (PLD) می شود (۶). فعال شدن فسفولیپازها به دنبال ایسکمی مغزی باعث رها سازی پیام رسان های ثانویه نظیر دی آسیل گلیسرول، فسفاتیدیک اسید، لیزوفسفاتیدیک اسید، دکوزاهگزانوئیک اسید، آراشیدونیک اسید می شود. آراشیدونیک اسید اسفنگومیلیناز را برای تولید سرآمد تحریک می کند و سرآمد آپوپتوزیس را از طریق مهار انتقال الکترونی میتوکندری و رها سازی سیتوکروم c القا می نماید. سیتوکروم c مرگ سلولی آپوپتوز را توسط آبخاری که با کاسپاز ۳ فعال می شود شروع می کند (۶). ممکن است در اثر تیمار با روغن زیتون بکر که باعث کاهش سرآمد مغزی می شود در طی ایسکمی میزان سرآمد کمتر و مرگ سلولی آپوپتوز القا شده نیز کمتر شود و در نتیجه باعث کاهش حجم سکنه مغزی گردد. مهار سنتز فسفاتیدیل کولین از طریق مهار CCT باعث مرگ سلول می شود. سکنه باعث کاهش فعالیت CCT و پروتئین CCT α خواهد شد که به طور جزئی توسط CDP کولین ذخیره می شوند.

تیمار با CDP کولین به طور چشمگیری حجم سکنه را به میزان $0/05 \pm 5$ حدود ۱ ساعت بعد از t MCAO (transient middle cerebral artery occlusion) و ۱ روز پس از خونرسانی مجدد کاهش می دهد. CDP کولین

(cytidine-5'-diphosphocholine) به طور چشمگیری سطح فسفاتیدیل کولین را با تأثیرات متفاوت بر فسفاتیدیل کولین فسفولیپاز (cptdcho- PLC) و CCTα، بعد از ایسکمی کانونی گذرا دوباره ذخیره می کند (۶). تیمار با روغن زیتون بکر باعث افزایش سطح فسفاتیدیل کولین مغزی در گروه های آزمایشی می شود و شاید از این طریق باعث کاهش مرگ سلولی در طی ایسکمی و خونرسانی مجدد می شود و در نتیجه باعث کاهش حجم سکنه مغزی می گردد.

گالاکتوسربروزید ها و سولفاتیدها از مهمترین ترکیبات لیپیدی غشای میلینی هستند. سربروزیدها و سولفاتیدها توسط آنزیم های لیزوزومی هیدرولیز می شوند و تخریب آنها در شرایط فیزیولوژیکی به پروتئین های فعال کننده و pH اسیدی نیاز دارد و آزاد شدن این آنزیم ها به داخل سیتوپلاسم در طی آسیب ایسکمی اتفاق می افتد. سربروزیدها و سولفاتیدها بازگشت متابولیکی آهسته ای در مغز بالغ نرمال دارند بنابراین کاهش غلظت آنها در طی ایسکمی می تواند دلیل کاهش pH درون سلولی باشد (۷). پیش تیمار با روغن زیتون بکر در دوز ۰/۷۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در روز باعث افزایش محتوی سربروزیدهای مغزی شد. افزایش سربروزیدها در اثر تیمار با روغن زیتون بکر

ممکن است باعث افزایش مقاومت غشای میلینی در برابر آسیب ایسکمی شود در نتیجه باعث کاهش حجم سکنه مغزی ناشی از مرگ سلولی می گردد. در حال حاضر بیشتر تحقیقات بر روی نقش آنتی اکسیدانی روغن زیتون متمرکز شده است. ترکیبات فنولی این روغن به عنوان آنتی اکسیدان های قوی جمع کننده های رادیکال های آزاد و تعدیل کننده های آنزیم های وابسته به اکسیژن عمل می کنند (۱۸).

نتیجه گیری:

پیش تیمار با روغن زیتون بکر از طریق تغییر در سطح لیپیدهای مغزی باعث کاهش مرگ سلولی و در نتیجه کاهش حجم سکنه مغزی در موش های صحرایی در معرض ایسکمی و خونرسانی مجدد می شود. در نتیجه روغن زیتون می تواند یک گزینه ایده آل برای پیش درمان سکنه مغزی در علم پزشکی باشد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه با همکاری پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد که کمال تقدیر و تشکر را از اساتید این پژوهشکده داریم.

منابع:

1. Warner DS, Sheng H, Batinic- Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol. 2004 Aug; 207: 3221-31.
2. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Syder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA. 1991 Jul; 88(14): 6368-71.
3. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Feb; 87(4): 1620-4.
4. Linnik MD, Miller JA, Sprinkle- Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, et al. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. Brain Res Mol Brain Res. 1995 Aug; 32(1): 116-24.
5. Rami A, Bechmann I, Stehle JH. Exploiting endogenous anti- apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. Prog Neurobiol. 2008 Jul; 85(3): 273-96.
6. Adibhatla RM, Hatcher J, Dempsey R. Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. AAPS J. 2006; 8: 314-21.

7. DeGirolami U, Zivin JA. Neuropathology of experimental spinal cord ischemia in the rabbit. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1982 Mar; 41(2): 129-49.
8. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981 Nov-Dec; 12(6): 723-5.
9. Gonzalez-Correa JA, Navas MD, Lopez- Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, Cruz JP. Amage in rat dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular Damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids*. 2007; 42: 921-29.
10. Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, Introno AD, Capurso C, Torres F, Del Parigi A, et al. Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr*. 2004 Oct; 7(7): 959-63.
11. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan; 20(1): 84-91.
12. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasoulilian B, Asgari AR, et al. Normobarichyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF- α level. *Exp Neurol*. 2008 Aug; 212(2): 298-306.
13. Denny CA, Kasperzyk JL, Gorham KN, Bronson RT, Seyfried TN. Influence of Caloric Restriction on Motor Behavior, Longevity, and Brain Lipid Composition in Sandhoff Disease Mice. *J Neurosci Res*. 2006 May; 83(6): 1028-38.
14. Macala LJ, Yu RK, Ando S. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J Lipid Res*. 1983 Sep; 24(9): 1243-50.
15. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulilian B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *Scientific World J*. 2010 Jun; 10: 1180-91.
16. Bu Y, Rho S, Kim J, Kim MY, Lee DH. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2007 Mar; 414(3): 218-21.
17. Fki I, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *Agric Food Chem*. 2007 Feb; 55(3): 624-31.
18. Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*. 2002 Jan; 22(1): 65-75.

Effect of dietary virgin olive oil on infarct volume and brain ceramide, cerebroside and phosphatidylcholine levels in rat stroke model

Rabiei Z (MSc)¹, Bigdeli MR (PhD)^{2*}, Mohagheghi F (MSc)²

¹Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. Iran

Received: 17/Jul/2012 Revised: 30/Sep/2012 Accepted: 20/Jan/2013

Background and aims: Stroke is the third most common cause of death in most industrialized countries after cardiovascular diseases and cancer. The aim of this study was assessment of relationship between the effect of virgin olive oil and brain lipid levels and infarct volume in rat stroke model.

Methods: Five groups, each consisting of 12 male Wistar rats, were studied. The groups consisting of control, sham and three treatment group received oral virgin olive oil (VOO) for 30 days (0.25, 0.5 and 0.75 ml/kg/day, respectively), control and sham groups received distilled water. Two hours after the last dose for rats, each main group was divided to 2 subgroups middle cerebral artery occlusion (MCAO)-operated for assessment of infarct volume and "brain lipids level". The lipids (cerebroside, ceramide, phosphatidylcholine) and infarct volume were compared using One way ANOVA (post hoc LSD). The assessment of relationship between brain lipids and infarct volume was done with correlation Pearson.

Results: VOO increased the brain phosphatidylcholine level in doses of 0.5 and 0.75 ml/kg/day. VOO in dose of 0.75 ml/kg/day increased the brain cerebroside level. Pretreatment with VOO decreased the brain ceramide levels in doses of 0.5 and 0.75 ml/kg/day ($P < 0.05$). Oral administration of VOO reduced infarct volume after transient MCAO in rats. There was significant relationship between increase of brain phosphatidylcholine level and decrease of infarct volume ($P = 0.000$, $r^2 = 0.45$). There was significant relationship between increased brain cerebroside levels and decrease of infarct volume ($P = 0.018$, $r^2 = 0.28$). There was significant relationship between decrease brain ceramide levels and infarct volume ($P = 0.000$, $r^2 = 0.62$).

Conclusion: VOO partly is associated with change in brain lipids levels and decrease in infarct volume or neuroprotection in rat.

Keywords: Brain ischemia, Ceramide, Cerebroside, Phosphatidylcholine, Rat, Virgin olive oil.

Cite this article as: Rabiei Z, Bigdeli MR, Mohagheghi F. Effect of dietary virgin olive oil on infarct volume and brain ceramide, cerebroside and phosphatidylcholine levels in rat stroke model. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Apr, May; 15(1): 23-31.

***Corresponding author:**

Biology Sciences faculty, Shahid Beheshti University, Velenjak highway, Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982129902731, E-mail: bigdelimohammadreza@yahoo.com